

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008628829

WPI Acc No: 1991-132859/*199118*

XRAM Acc No: C91-057335

Human interleukin-2 prodn. in yeast cells - as fusion protein with
alpha-factor prepropeptide

Patent Assignee: LENINGRAD ZHDANOV UNIV (LEZH)

Inventor: AVOT A Y; GREN E Y; MYASNIKOV A N; OSTANIN K V; ROMANCHIKO N V;
SMIRNOV M N; TSIMANIS A J

Number of Countries: 016 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9105052	A	19910418				199118 B
AU 9053522	A	19910428				199131

Priority Applications (No Type Date): WO 89SU257 A 19890928

Cited Patents: EP 142268; EP 194818; US 4738927

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9105052	A				

Designated States (National): AU DK FI JP NO US

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

Abstract (Basic): WO 9105052 A

Prodn. of a polypeptide (I) with human interleukin-2 (IL-2) activity is effected by (a) constructing a recombinant DNA mol. in which a DNA sequence coding for a fusion protein comprising a substance described as alpha-factor prepropeptide and human IL-2 is under the control of a hybrid promoter, and (6) expressing the DNA mol. in *Saccharomyces cerevisiae* cells.

Also claimed is the recombinant plasmid pJDB(ALPHOIL) and the *S.cerevisiae* strain GRF18-pJDB(ALPHOIL) (USSR Accession no. VKPM-Y1038).

ADVANTAGES - The new strain is highly stable and gives high yields of (I) having almost the same specific activity as native IL-2. (24pp Dwg.No.1/3)

Title Terms: HUMAN; INTERLEUKIN; PRODUCE; YEAST; CELL; FUSE; PROTEIN; ALPHA ; FACTOR

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12N-001/19; C12N-015/26

File Segment: CPI

BEST AVAILABLE COPY

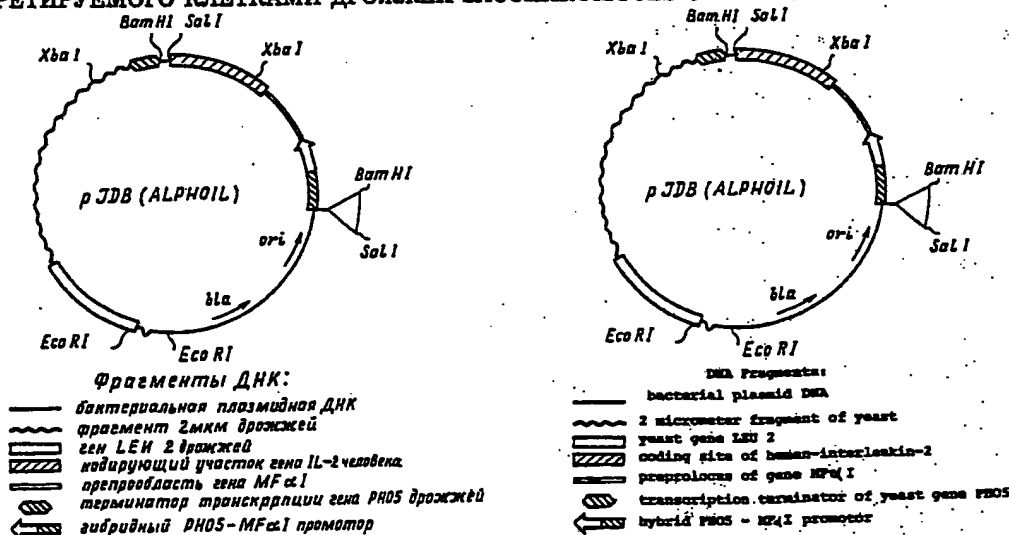


МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

<p>(51) Международная классификация изобретения 5: C12N 15/26, 1/19, 15/81</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Номер международной публикации: WO 91/05052 (43) Дата международной публикации: 18 апреля 1991 (18.04.91)</p>
<p>(21) Номер международной заявки: РСТ/SU89/00257 (22) Дата международной подачи: 28 сентября 1989 (28.09.89) (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ [SU/SU]; Ленинград 199034, Университетская набережная, д. 7/9 (SU) [LENIN-GRADSKY GOSUDARSTVENNY UNIVERSTTET, Leningrad (SU)]. (72) Изобретатели; и (75) Изобретатели / Заявители (только для US): МЯСНИКОВ Андрей Новомирович [SU/SU]; Ленинград 199022, ул. Кораблестроителей, д. 16, кв. 61 (SU) [MYASNIKOV, Andrei Novomirovich, Leningrad (SU)]. СМІРНОВ Михаил Николаевич [SU/SU]; Ленинград 198035, ул. Маяковского, д. 3, кв. 38 (SU) [SMIRNOV, Mikhail Nikolaevich, Leningrad (SU)]. ОСТАНИН Кирилл Вениаминович [SU/SU]; Ленинград 194350, пр. Художников, д. 7, корп. 2, кв. 24 (SU) [OSTANIN, Kirill Veniaminovich, Leningrad (SU)]. АВОТ Андрис Янович [SU/SU]; Рига 226067, ул. Маза Булло, д. 9, кв. 1 (SU) [AVOT, Andris Ya-</p>		<p>Yanovich, Riga (SU). ГРЕН Элмар Янович [SU/SU]; Рига 226059, ул. Лаймдотес, д. 61, кв. 28 (SU) [GREN, Elmar Yanovich, Riga (SU)]. РОМАНЧИКОВА Надежда Викторовна [SU/SU]; Рига 226005, ул. Патвертнес, д. 7, кв. 15 (SU) [ROMAN-CHIKOVA, Nadezhda Viktorovna, Riga (SU)]. ЦИМАНИС Александр Юрьевич [SU/SU]; Рига 226069, ул. Рудзутака, д. 54, кв. 37 (SU) [TSIMANIS, Alex-andr Jurievich, Riga (SU)]. (74) Агент: ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА СССР; Москва 109785, ул. Куйбышева, д. 5/2 (SU) [THE USSE CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY, Moscow (SU)]. (81) Указанные государства: АТ (европейский патент), АУ, ВЕ (европейский патент), СН (европейский патент), DE (европейский патент)*, ДК, FL, FR (европейский патент), GB (европейский патент), IT (европейский патент), JP, LU (европейский патент), NL (европейский патент), NO, SE (европейский патент), US. Опубликована С отчетом о международном поиске.</p>

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A POLYPEPTIDE WITH HUMAN-INTERLEUKIN-2 ACTIVITY, SECRETED BY YEAST CELLS, SACCHAROMYCES CEREVISIAE

(54) Название изобретения: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА С АКТИВНОСТЬЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА, СЕКРЕТИРУЕМОГО КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE



(57) Abstract

The invention relates to biotechnology and, in particular, to genetic engineering methods for obtaining recombinant proteins in yeast cells. The aim of the invention is to create a yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae*, capable of effective synthesis and secretion of a polypeptide with human-interleukin-2 activity, as well as to provide for the possibility of effectively controlling such a synthesis by varying the conditions for the strain cultivation, which is necessary for the stable maintenance of the strain and for the possibility of its industrial cultivation. A method is described for obtaining yeast strain producers secreting a polypeptide with human-interleukin-2 activity, a construction and a method of construction of a recombinant plasmid providing for the synthesis and secretion of interleukin-2. The increased stability and productivity of these strains as compared with those known up to now is achieved by the use, in the plasmid construction, of a hybrid yeast promoter. The yeast strain cells carrying such plasmids secrete into a cultural medium a protein having the human-interleukin-2 activity in a quantity of about several milligrams per litre of yeast culture. The specific biological activity of said protein practically equals that of natural interleukin-2.

Изобретение относится к биотехнологии и, в частности, к генно-инженерным способам получения рекомбинантных белков в клетках дрожжей.

Целью изобретения является создание штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способного к эффективному синтезу и секреции полипептида с активностью интерлейкина-2 человека, а также обеспечение возможности эффективно регулировать такой синтез за счет изменения условий культивирования штамма, что необходимо для стабильного поддержания штамма и возможности его крупномасштабного выращивания.

Описан способ получения дрожжевых штаммов-продуцентов, секретирующих полипептид с активностью интерлейкина-2 человека, конструкция и способ конструирования рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез и секрецию интерлейкина-2. Повышение стабильности и продуктивности этих штаммов по сравнению с известными ранее достигается использованием в конструкции плазмиды гибридного дрожжевого промотора. Клетки штаммов дрожжей, несущих такие плазмиды, секретируют в культуральную среду белок с активностью интерлейкина-2 человека в количестве порядка нескольких миллиграммов на литр дрожжевой культуры. Удельная биологическая активность этого белка практически равна удельной активности природного интерлейкина-2.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT	Австрия	ES	Испания	MG	Мадагаскар
AU	Австралия	FI	Финляндия	ML	Мали
BB	Барбадос	FR	Франция	MR	Мавритания
BE	Бельгия	GA	Габон	MW	Малави
BF	Буркина Фасо	GB	Великобритания	NL	Нидерланды
BG	Болгария	GR	Греция	NO	Норвегия
BJ	Бенин	HU	Венгрия	PL	Польша
BR	Бразилия	IT	Италия	RO	Румыния
CA	Канада	JP	Япония	SD	Судан
CF	Центральноафриканская Республика	KR	Корейская Народно-Демократическая Республика	SE	Швеция
CG	Конго	KR	Корейская Республика	SN	Сенегал
CH	Швейцария	LI	Лихтенштейн	SU	Советский Союз
CM	Камерун	LK	Шри Ланка	TD	Чад
DE	Германия	LU	Люксембург	TG	Того
DK	Дания	MC	Монако	US	Соединенные Штаты Америки

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА С АКТИВНОСТЬЮ
ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА, СЕКРЕТИРУЕМОГО
КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Область технологии

Изобретение относится к биотехнологии и, в частности, к генной инженерии и представляет собой способ получения полипептида с активностью интерлейкина-2 человека, секретируемого клетками дрожжей, способ конструирования рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез и секрецию интерлейкина-2, и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - секреторный продуцент человеческого интерлейкина-2.

15 Предшествующий уровень технологии

Интерлейкин-2 относится к группе белков, называемых лимфокинами. Эти белки играют ключевую роль в регуляции иммунной системы организма и рассматриваются в качестве чрезвычайно перспективных лекарственных средств для лечения некоторых форм иммунодефицита, а также в онкологии.

Наиболее перспективным путем получения препаратов очищенного интерлейкина-2 для его использования в качестве терапевтического средства в настоящее время является создание генно-инженерным путем штаммов микроорганизмов - продуцентов интерлейкина-2 человека.

Известен ряд созданных генно-инженерным путем штаммов бактерий и дрожжей - продуцентов интерлейкина-2 человека (табл. 1). Однако, все штаммы-продуценты, перечисленные в табл.1, обладают рядом существенных недостатков. Во-первых, при продукции интерлейкина-2 в клетках бактерий *E.coli* возникает проблема его последующей очистки от следовых количеств примесей бактериальных эндотоксинов. Во-вторых, внутриклеточный синтез интерлейкина-2 как в клетках *E.coli*, так и в клетках дрожжей, приводит к образованию нерастворимого агрегированного белка, у которого восстановлены дисульфидные связи,

присутствующие в нативном интерлейкине-2.

Таблица 1.

5 **ИЗВЕСТНЫЕ ШТАММЫ-МИКРООРГАНИЗМОВ,
ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ИНТЕРЛЕЙКИН-2 ЧЕЛОВЕКА**
(приведены уровни биосинтеза в единицах, использованных авторами, в
скобках - приблизительный пересчет в мг/л культуры)

10	Название штамма	Организм-хозяин и тип промотора	Уровень синтеза интерлейкина-2.	Источник данных
	C-4/pTF4	E. coli	0,4-1 мг/г клеток (10 мг/л)	[1]
15	MM294/pLW21	E. coli промотор trp	0,1 млн ед/мл клеточн. экстракта (1-10 мг/л)	[2]
	TGY1sp1/pTG853	S. cerevisiae промотор PGK	7 ед/мл клеточн. экстракта (< 1 мкг/л)	[3]
	AN22/pYIL2-21	S. cerevisiae промотор PH05	1-10 тыс. ед/мл клеточн. экстракта (0,01-0,1 мг/л)	[4]
20	GRF18-pJDB(MSIL)	S. cerevisiae промотор PH05	30 мг/л	[5]

[1] Kitano K., Fujimoto S., Европейский патент A2 0 194 818 (1986).

25 [2] Mark D.F. ea, Патент США US 4,518,584 (1985).

[3] Lemoine Y. ea, Международный патент WO 85/03723 (1985).

[4] Taniguchi T. ea, Европейский патент EP A1 0 091 539 (1984).

[5] Мясников А.Н. и др. положительное решение по авт. заявке
N 4392922/13 (1988).

30

Биосинтез интерлейкина-2 в денатурированной форме, обуславливает то, что для его солюбилизации необходимо применение сильных денатурантов типа додецилсульфата натрия или гуанидин гидрохлорида, а это, в свою очередь, затрудняет последующую очистку интерлейкина-2.

Кроме того, биологическая активность восстановленного интерлейкина-2 значительно ниже, чем у того же белка, имеющего правильно замкнутые дисульфидные связи. Перспективным способом устранения перечисленных недостатков является создание штаммов-5 продуцентов интерлейкина-2, у которых биосинтез этого белка сопряжен с его секрецией в культуральную среду. При этом белки, содержащие дисульфидные связи, образуются, как правило, в нативной форме и, следовательно, в растворимом и биологически активном состоянии. Кроме того, при очистке белка отпадает необходимость в разрушении 10 клеток, а сама очистка существенно упрощается, поскольку количество примесных белков в культуральной среде значительно меньше, чем внутри клеток. Известны штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - секреторные продуценты интерлейкина-2 человека [Oshima T. ea, Европейский патент EP 0 171 000 A2 (1986); Вагг Р., ea, WO 15 85/02200]. Однако, плазмиды pYIL241 и pIL-2, описанные в этих патентах, имеют существенный недостаток, а именно, экспрессия гена интерлейкина-2 под контролем этих плазмид не регулируется в зависимости от условий культивирования. Следствием этого, а также 20 токсичности для дрожжей интерлейкина-2, экспрессируемого в подобных системах, является нестабильность штамма-продуцента. Кроме того, для селекции трансформированных клеток и репликации плазмиды pYIL241 используется ген TRP1, содержащий собственный ARS (участок ДНК, обеспечивающий репликацию плазмиды в клетках дрожжей). Известно, что 25 стабильность и поддерживаются в клетках дрожжей в невысоком числе копий. Авторами цитированных заявок не приводятся количественные данные относительно уровня продукции интерлейкина-2 и стабильности штаммов. Однако, из данных электрофоретического анализа культуральной среды штамма JA221/pYIL241, имеющихся в работе [Oshima 30 T. ea, Европейский патент EP 0 171 000 A2 (1986)], видно, что содержание интерлейкина-2 невелико и составляет величину порядка нескольких процентов от всех секреторных белков данного штамма.

Раскрытие изобретения

В основу настоящего изобретения положена задача создания штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способного к эффективному синтезу и секреции полипептида с активностью интерлейкина-2 человека, а также обеспечения возможности эффективно регулировать такой синтез за счет изменения условий культивирования штамма, что необходимо для стабильного поддержания штамма и возможности его крупномасштабного выращивания.

10

Решение технологической задачи.

Поставленная задача решается за счет усовершенствования конструкции рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей биосинтез полипептида и секрецию полипептида с активностью интерлейкина-2 клетками дрожжей, а именно, использованием гибридной конструкции дрожжевого промотора. В этой конструкции используются регуляторный участок дрожжевого промотора, активность которого значительно варьирует в зависимости от условий культивирования (например промотора PHO5), и участки промотора, определяющие точку старта транскрипции, а также часть кодирующей области (области препептида) гена MF α 1. Дополнительным существенным условием решения поставленной задачи является включение в состав рекомбинантной плазмиды элементов, обеспечивающих ее накопление в клетках дрожжей в высоком числе копий и повышающих стабильность поддержания при культивировании, - репликатора двумикронной ДНК и дефектного гена LEU2 из известной плазмиды pJDB207 [Beggs J.D.: Gene cloning in yeast. In "Genetic engineering", Williamson R. ed, vol. 2, Academic press, London (1981)]. Подходящими для трансформации подобными плазмидами штаммами дрожжей являются штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, несущие неревертирующую мутацию в гене LEU2.

30

Краткое описание рисунков.

В дальнейшем изобретение поясняется подробным описанием примеров его осуществления со ссылками на прилагаемые рисунки:

5

Фиг. 1. Иллюстрирует строение рекомбинантной плазмиды pJDB(ALPHOIL), обеспечивающей биосинтез и секрецию интерлейкина-2 клетками дрожжей.

10

Фиг. 2. Иллюстрирует способ конструирования плазмиды pAC137, несущей гибридный PHO5-MF α 1 промотор.

Фиг. 3. Иллюстрирует способ конструирования плазмиды pJDB(ALPHOIL).

15

Предпочтительный вариант осуществления изобретения

Плазмида pJDB(ALPHOIL), трансформация которой позволяет получить дрожжевой штамм с перечисленными свойствами, состоит из следующих элементов:

20

- фрагмент плазмидной ДНК бифункционального бактериально-дрожжевого вектора pJDB207, ограниченный рестрикционными сайтами HindIII и SalI, размером 6,3 т.п.о., включающий бактериальный ген устойчивости к ампициллину, бактериальную область инициации репликации, дрожжевой ген LEU2, а также фрагмент дрожжевой двумикронной плазмиды, обеспечивающий репликацию плазмиды в клетках дрожжей;

25

- фрагмент полилинкера плазмиды pUC19, ограниченный рестрикционными сайтами SalI и BamHI, размером 20 п.о.;

30

- BamHI-Sau3A фрагмент промотора гена PHO5 дрожжей, размером 0,35 т.п.о., содержащий участок, ответственный за регуляцию активности промотора неорганическим фосфатом;

- Eco47I-HindIII фрагмент гена MF α 1 дрожжей, содержащий часть промотора и препрообласть кодирующего участка этого гена,

размером 0,45 т.п.о.;

- Cfr13I-SalI фрагмент плазмиды pAA12.13-23 [Авот А.Я. и др. Авторское свидетельство СССР по заявке N 4140988/3113, (1987)], содержащий кодирующую часть гена интерлейкина-2 человека, размером 0,56 т.п.о.;

- SmaI-HindIII фрагмент плазмиды pMS46 [Останин К.В. и др., Биополимеры и клетка т.4, N 4, стр. 224-231 (1988)], содержащий терминатор транскрипции гена PHO5 дрожжей размером 0,4 т.п.о.

Общий размер плазмиды 8,1 т.п.о. (молекулярная масса 5,3 Мд), строение плазмиды проиллюстрировано на фиг. 1.

Для достижения цели используют способ конструирования плазмиды pJDB(ALPHOIL), заключающийся в том, что EcoRI-EcoRI фрагмент ДНК плазмиды p69A [Kuzjan J., Herskowitz I., Cell 30, pp. 933-943 (1983)], содержащий ген MF α 1, (размер фрагмента 1,6 т.п.о.) клонируют в EcoRI сайте плазмиды pUC19. Из полученной таким образом плазмиды pUC(MF)-2 выделяют 1,1 т.п.о. фрагмент ДНК, ограниченный рестрикционными сайтами SalI и HindIII и содержащий промотор и начало кодирующей области гена MF α 1, и лигируют его с гидролизованым SalI и HindIII челночным бактериально-дрожжевым вектором pJDB207 [Beggs J.D.: Gene cloning in yeast. In "Genetic engineering", Williamson R. ed, vol. 2, Academic press, Londdon (1981)], получая в результате плазмиду pAC313. Далее плазмиду pUC(MF)-2 гидролизуют рестриктазой Eco47I, обрабатывают "кленовским" фрагментом ДНК-полимеразы I, гидролизуют HindIII, и очищают фрагмент ДНК размером 0,51 т.п.о. Этот фрагмент лигируют с векторной частью плазмиды pAC313, гидролизованной рестриктазами SmaI и HindIII, получая плазмиду pAC313-1. Затем плазмиду pAC313-1 гидролизуют рестриктазой BamHI и лигируют с 0,35 т.п.о. BamHI-Sau3A фрагментом ДНК плазмиды pVY18 [Останин К.В. и др., Биополимеры и клетка т.4, N 4, стр. 224-231 (1988)], несущим регуляторный участок промотора дрожжевого гена PHO5. Таким образом конструируется плаزمида pAC137, в которой содержится начало кодирующей области гена MF α 1 (соответствующее препро-области белкового продукта этого гена) под контролем "гибридного" промотора, активность которого регулируется в

зависимости от содержания неорганического фосфата в культуральной среде.

Ген интерлейкина-2 выделяют в составе Cfr13I-Cfr13I фрагмента ДНК плазмиды pAA12.13-23. Этот фрагмент обрабатывают "кленовским" фрагментом ДНК-полимеразы I и лигируют с гидролизованной рестриктазой HindIII и обработанной "кленовским" фрагментом ДНК-полимеразы I плазмидой pAC137 (получая плазмиду pACIL). Далее, с целью слияния полученной конструкции с дрожжевым терминатором транскрипции из плазмиды pACIL выделяют 1 т.п. SalI-XbaI фрагмент ДНК. Этот фрагмент одновременно лигируют с 0,9 т.п. XbaI-HindIII фрагментом ДНК плазмиды pMSIL [Мясников А.Н. и др. положительное решение по авт. заявке N4392922/13 (1988)] и векторной частью плазмиды pJDB207. Полученная вышеописанным образом окончательная генно-инженерная конструкция (плазмида pJDB(ALPHOIL)), несет слитые в одной рамке считывания кодирующие участки генов MF α 1 (часть гена, соответствующая препрообласти белка предшественника альфа-фактора) и гена интерлейкина-2 (часть гена, соответствующая зрелому полипептиду интерлейкина-2). Экспрессия слитого белка находится под контролем "гибридного" PHO5-MF α 1 промотора, в котором регуляторный участок гена PHO5 обеспечивает возможность его репрессии неорганическим фосфатом, а 3'-концевой участок промотора гена MF α 1 определяет точку инициации транскрипции и кодирует природную структуру лидерной области мРНК. Эффективная терминация транскрипции обеспечивается за счет присутствия в плазмиде транскрипционного терминатора гена PHO5. Основные этапы конструирования плазмиды pJDB(ALPHOIL) проиллюстрированы на фиг. 2 и 3. Существенной особенностью строения плазмиды pJDB(ALPHOIL) является то, что слияние кодирующих областей генов MF α 1 и гена интерлейкина-2 проведено в точке протеолитического процессинга белка-предшественника альфа фактора. Поскольку процессинг слитых таким образом белков обычно проходит аналогично процессингу природного белка-предшественника альфа фактора, секретируемый в культуральную среду полипептид имеет структуру природного белка.

Для достижения цели используют штамм дрожжей *Saccharomyces*

сerevisiae GRF18-pJDB(ALPHOIL), полученный трансформацией штамма GRF18 плазмидой pJDB(ALPHOIL). Выбор штамма GRF18 в качестве штамма-реципиента обусловлен тем, что этот штамм несет неревертирующую мутацию в гене LEU2, что позволяет отбирать трансформированные плазмидой клетки и стабильно поддерживать штамм GRF18-pJDB(ALPHOIL) на селективных средах, не содержащих лейцина.

Содержание ингерлейкина-2 в культуральной среде штамма GRF18-pJDB(ALPHOIL) составляет примерно 1 мг/л.

10 Описание эксперимента.

Пример 1.

Клетки бактерий *E.coli*, содержащие плазмиду pB9A, выращивают в течение ночи в 500 мл питательной среды LB (1 проц. пептона, 0,5 проц. дрожжевого экстракта, 1 проц. хлористого натрия), в которую добавлен ампициллин в концентрации 50 мг/л. Клетки собирают центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин, 4 град.), ресуспендируют в 10 мл буфера для лизиса (25 мМ трис-гидрохлоридный буфер pH 8,0, содержащий 10мМ ЭДТА и 50мМ глюкозу), добавляют 20 мг лизоцима и инкубируют 10 мин при 4 град. Далее добавляют 10 мл 0,2М гидроокиси натрия, содержащей 1 проц. додецилсульфата натрия. После осторожного перемешивания в течение примерно 1 мин, раствор нейтрализуют 10 мл 3М ацетата натрия, pH 5,3. Далее препарат выдерживают при 4 град. в течение 1 часа и центрифугируют при 20000 об/мин (центрифуга J2-21, "Бектманн", 4 град.). К супернатанту добавляют 0,6 объема изопропилового спирта и отделяют осадок низкоскоростным центрифугированием (5000 об/мин) при 4 град. Осадок высушивают в вакууме, растворяют в 3,5 мл воды, прибавляют 3,5 г хлористого цезия и 100 мкл раствора бромистого этидия (10мг/мл) и центрифугируют при 50000 об/мин в течение 12-16 час на центрифуге L5-50 ("Бектманн") в роторе VTi80. После центрифугирования отбирают полосу плазмидной ДНК (нижнюю из двух флюоресцирующих полос в центре пробирки), дважды экстрагируют бромистый этидий равным объемом изоамилового спирта, разбавляют раствор хлористого цезия

- водой в 2 раза и осаждают ДНК двумя объемами этилового спирта. Осадок, отделенный центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин) промывают 70 процентным этанолом, высушивают в вакууме и растворяют в воде (500 мкл). Концентрацию плазмидной ДНК определяют по оптической плотности раствора при 260 нм (оптическая плотность 1 соответствует концентрации 50 мкг/мл), чистоту препарата контролируют электрофорезом в агарозном геле (0,7 проц. агарозы в буфере TBE - 0,1М трис-борат, содержащий 1мМ ЭДТА и 1 мг/л бромистого этидия).
- 5
- 10 Гидролиз плазмиды рb9A рестриктазой EcoRI проводят в 10мМ трис-гидрохлоридном буфере, содержащем 10 мМ хлористый магний, 100 мМ хлористый натрий, 1 мМ дитиотреитол и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (буфер ВС). К 50 мкг ДНК в объеме 200 мкл прибавляют 100 ед. рестриктазы и проводят реакцию при 30 град. в течение 2 часов. Контроль за полнотой гидролиза ведут с помощью электрофореза в агарозном геле. Реакционную смесь вносят в лунку (2x50 мм) агарозного геля, рядом с лункой для очищаемого препарата ДНК вырезают лунку (5x3 мм) для нанесения стандартов молекулярного веса (ДНК фага лямбда, гидролизованная PstI) и проводят электрофорез при напряжении 5 в/см в течение 2-3 часов. Нужную полосу перед элюцией идентифицируют, сравнивая ее подвижность с подвижностью фрагментов ДНК стандартного гидролизата, приготовленного как описано выше. Непосредственно перед полосой фрагмента ДНК размером 1,6 т.п.о. вырезают лунку (3x60 мм) и помещают в эту лунку
- 15
- 20
- 25
- 30
- 30

Гидролиз 10 мкг плазмиды рUC19, выделение которой аналогично выделению плазмиды рb9A, проводят с помощью 30 ед. рестриктазы EcoRI в 50 мкл буфера ВС в течение 2 часов при 37 град.

Очистку линейной формы плазмиды проводят, как описано выше для фрагмента ДНК плазмиды р69А.

Для получения плазмиды, обозначенной рUC(MF)-2, линейную форму плазмиды рUC19 лигируют с фрагментом ДНК плазмиды р69А, несущим ген MF α 1. Для этого оба фрагмента ДНК, очистка которых описана
5 выше, смешивают в количестве по 0,1 мкг в 10 мкл 70мМ трис-
гидрохлоридного буфера, рН 7,6, содержащего 5 мМ дитиотреitol, 5 мМ
хлористый магний, 1мМ АТФ. Для проведения реакции лигирования
добавляют 10 ед. ДНК-лигазы фага Т4 и проводят инкубацию в течение
10 ночи при 4 град.

Полученной таким образом лигазной смесью трансформируют клетки E.coli HB101. Для этого клетки E.coli выращивают в 100 мл среды LB при 37 град. и интенсивном перемешивании до достижения
15 оптической плотности при 600 нм 0,4-0,5. Культуру охлаждают на
льду, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин при 0 град.,
ресуспендируют в 50 мл 0,1М хлористого кальция, инкубируют на
ледяной бане 40 мин, повторно центрифугируют при тех же условиях,
суспендируют в 5 мл раствора хлористого кальция, добавляют глицерин
до 20 проц. Полученные таким образом компетентные клетки
20 расфасовывают аликвотами по 200 мкл и хранят замороженными при -70
град. до использования. Для трансформации компетентные клетки
E.coli размораживают в ледяной бане, добавляют к суспензии клеток
смесь продуктов лигазной реакции и проводят инкубацию в ледяной
бане в течение 40 мин. Далее клетки подвергают тепловому шоку в
25 течение 2 мин при 42 град., после чего инкубируют в 1,5 мл среды LB
при 37 град. в течение 1 часа. Суспензию клеток концентрируют
центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин и растирают по
поверхности чашки с той же питательной средой, содержащей 2 проц.
агара и 50 мг/л ампициллина.

30 Из полученных вышеописанным образом отдельных клонов трансформантов выделяют плазмидную ДНК методом, аналогичным методу
выделения плазмиды р69А, с тем отличием, что выращивание клеток
E.coli ведут в 10 мл питательной среды и все объемы растворов
соответственно уменьшают в 50 раз по сравнению с указанными. Кроме

того, вместо последней стадии очистки (центрифугирования в растворе хлористого цезия) используют обработку панкреатической РНКазой. Для этого осадок нуклеиновых кислот, полученный при осаждении изопропанолом, растворяют в 100 мкл буфера для рестрикции и обрабатывают 10 мкл раствора РНКазы (1 мг/мл) в течение 30 мин при 37 град. Такой препарат используют для рестрикционного анализа строения плазмид в индивидуальных клонах. В случае плазмиды рUC(MF)-2 анализ проводят следующим образом. К порциям по 3 мкл препарата плазмиды добавляют по 7 мкл буфера ВС и далее отдельные порции обрабатывают следующими комбинациями рестрикционных эндонуклеаз (по 10 ед.): SalI+HindIII (искомая плазида дает фрагменты 1,1, 0,5 т.п.о.) и EcoRI (фрагмент 1,6 т.п.о.). Из отобранного таким образом трансформантного клона, содержащего плазмиду рUC(MF)-2, препаративно выделяют плазмидную ДНК, как описано для плазмиды р69А.

15 С целью получения плазмиды рАС313 плазмидную ДНК рUC(MF)-2 (50 мкг) гидролизуют смесью (по 100 ед.) рестриктаз SalI и HindIII в 100 мкл буфера ВС в течение 3 часов при 37 град. Фрагмент ДНК размером 1,1 т.п.о очищают электрофорезом в агарозном геле, как описано выше. Теми же методами препаративно очищают векторный SalI-HindIII фрагмент плазмиды рJDB207. Лигируя два этих фрагмента, проводя трансформацию клеток E.coli и рестрикционный анализ трансформантных клонов рестриктазами SalI+HindIII, BamHI+HindIII, отбирают клон, содержащий плазмиду рАС313.

25 С целью получения плазмиды рАС313-1, плазмидную ДНК рUC(MF)-2 (50 мкг) гидролизуют 100 ед. рестриктазы Eco47I в 100 мкл буфера ВС в течение 3 часов при 37 град. Далее к раствору ДНК добавляют 100 мкл 100 мМ трис-гидрохлоридного буфера рН 7,4, содержащего 50 мМ хлористый магний, и все четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) в концентрации 1 мМ и 20 ед. "кленовского" фрагмента ДНК-полимеразы I. После инкубации в течение часа при 30 комнатной температуре, ДНК-полимеразу инактивируют нагреванием при 65 град. в течение 10 мин, после чего проводят гидролиз плазмидной ДНК 100 ед. рестриктазы HindIII в течение 2 часов при 37 град. Из полученного гидролизата фрагмент ДНК размером 0,51 т.п.о очищают

электрофорезом в агарозном геле, как описано выше. Теми же методами получают и препаративно очищают векторный SmaI-HindIII фрагмент плазмиды pAC313. Лигируя два этих фрагмента, проводя трансформацию клеток *E.coli* и рестрикционный анализ трансформантных клонов рестриктазами SalI+HindIII, BamHI+PstI, отбирают клон, содержащий плазмиду pAC313-1.

Плазмидный вектор pAC137 конструируют с применением вышеописанных методов по следующей схеме: из плазмиды pVY18, гидролизованной рестриктазой BamHI, выделяют 0,6 т.п.о. фрагмент ДНК, который дополнительно подвергают гидролизу эндонуклеазой Sau3A и из полученного гидролизата очищают фрагмент размером 0,35 т.п.о. Этот фрагмент лигируют с линейаризованной рестриктазой BamHI плазмидой pAC313-1 и после трансформации отбирают по данным рестрикционного анализа (BamHI+HindIII, Eco47III+HindIII) клон, несущий плазмиду pAC137.

Фрагмент ДНК, содержащий кодирующую часть гена интерлейкина-2 выделяют из гидролизованной рестриктазой Cfr13I плазмиды pAA12.13-23 и проводят обработку очищенного фрагмента (1 мкг) 3 ед. "кленовского" фрагмента ДНК-полимеразы I. Такой же обработке подвергают очищенную линейную форму вектора pAC137, гидролизованного эндонуклеазой HindIII. Лигируя эти два фрагмента ДНК и проводя трансформацию бактерий, отбирают по данным рестрикционного анализа (SalI+XbaI, фрагмент 1 т.п.о.) клон, несущий плазмиду pAC11, в которой фрагмент гена интерлейкина-2 находится в правильной ориентации относительно промотора.

С целью получения окончательной конструкции - плазмидного вектора экспрессии pJDB(ALPHOIL) - проводят одновременное лигирование трех очищенных фрагментов ДНК: 1 т.п.о. SalI-XbaI фрагмента плазмиды pAC11, 0,9 т.п.о. XbaI-HindIII фрагмента плазмиды pMS11, и векторного SalI-HindIII фрагмента плазмиды pJDB207, размером 6,3 т.п.о. Строение плазмиды pJDB(ALPHOIL) (фиг. 1) подтверждают рестрикционным анализом, используя рестриктазы EcoRI, SalI, BamHI и XbaI, а также их попарные комбинации.

Далее проводят трансформацию вектором экспрессии pJDB(ALPHOIL)

дрожжевых клеток, что иллюстрируется следующим примером.

Пример 2.

- 5 С целью получения штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, синтезирующего и секретирующего интерлейкин-2 человека, клетки дрожжей штамма GRF18 трансформируют плазмидой pJDB(ALPHOIL) следующим образом: Дрожжевой штамм-реципиент выращивают на среде YEPD (2 проц. пептона, 1 проц. дрожжевого экстракта, 2 проц.
- 10 глюкозы) до достижения культурой оптической плотности при 600 нанометрах - 2-4. Клетки дважды промывают водой и один раз 0,1M натрий-цитратным буфером, содержащим 1M сорбит, суспендируют в том же буфере и обрабатывают сначала 150 мкл меркаптоэтанола в течение 15 мин. при 30 градусах, а затем 150 мкл глюкуронидазы в течение 30-
- 15 60 мин. при той же температуре. Полученные таким образом сферопласты трижды промывают одномолярным сорбитом, суспендируют в 0,01M трисHCL буфере, содержащем 0,01M хлористого кальция и 1M сорбита, и после добавления 10 мкг ДНК плазмиды pJDB(ALPHOIL) инкубируют 30 мин. при
- 20 комнатной температуре. Затем к суспензии клеток добавляют 44 процентный раствор полиэтиленгликоля 4000 (Serva, ФРГ), выдерживают ее 30 мин. при 30 град., затем 2 мин. при 42 град. и высевают глубинным посевом на среду SChis (0,67 проц. Yeast nitrogen base ("Difco"), 2 проц. глюкозы, 50 мг/л гистидина), содержащую 1 процент агара.
- 25 С целью анализа продукции клетками трансформантов интерлейкина-2 их выращивают на среде ПЕП (2 проц. пептона, 2 проц. глюкозы) до достижения стационарной фазы роста, и отделяют клетки центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин. В супернатанте определяют содержание интерлейкина-2 иммуноферментным методом.
- 30 С целью анализа продукции интерлейкина-2 иммуноферментным методом тестируемые пробы разводят в соотношениях от 1:5 до 1:100 50мМ бикарбонатным буфером (рН 9,5), помещают в лунки пластиковых плат для иммуноферментного анализа. На ту же плату помещают ряд разведений очищенного интерлейкина-2 (в диапазоне 2-100 нг). Далее

- дают пробам высохнуть в течение ночи при комнатной температуре. После блокировки непрореагировавших реакционных сайтов платы инкубацией с однопроцентным раствором бычьего сывороточного альбумина при 37 град. в течение 30 мин. и промывки буфером PBS, в
- 5 лунки добавляют раствор моноклональных мышинных антител к интерлейкину-2 МКАТ-266-12 (полученных в Белорусском НИИ гематологии и переливания крови) (по 2 мкг на лунку), а затем, после еще одной промывки, разведенный 1:200 конъюгат видоспецифических антител, специфичных к мышинным гамма-глобулинам и
- 10 пероксидазы (фирмы "Sigma"). После инкубации сформированных таким образом комплексов с субстратным раствором (0,0003 проц. перекись водорода, 4 мг/мл орто-фенилендиамина в 0.1 М натрий-ацетатном буфере рН 4,6) и остановки реакции добавлением равного объема 2М серной кислоты, измеряют оптическую плотность при 486 нм.
- 15 Концентрацию интерлейкина-2 в анализируемых пробах определяют сравнивая величину поглощения в опытных образцах с полученной в том же опыте калибровочной кривой.

Согласно полученным таким образом данным, клетки дрожжей штамма GRF18, трансформированные плазмидой рJDB(ALPHOIL) секретируют в

20 культуральную среду примерно 1 мг интерлейкина-2 на литр дрожжевой культуры. В культуральной среде контрольного штамма дрожжей (штамм GRF18, трансформированный плазмидой рJDB207) по данным этого теста белки, иммунологически родственные интерлейкину-2, не обнаруживаются.

25 Стабильность уровня продукции интерлейкина-2 штаммом GRF-18-рJDB(ALPHOIL) проверяют следующим образом. Свежую колонию трансформанта засевают в 100 мл среды SChis (при росте на этой среде продукция интерлейкина-2 репрессирована высокой концентрацией неорганического фосфата) и выращивают до достижения стационарной

30 фазы роста. Из такой культуры 1 мл засевают в 100 мл свежей среды SC с гистидином и выращивают до стационарной фазы роста. Таким образом проводят еще четыре последовательных пересева. Далее дрожжевые клетки из 10 мл каждой культуры отделяют центрифугированием и засевают в 100 мл среды ПЕП (при росте на этой среде происходит

дерепрессия синтеза интерлейкина-2). При иммуноферментном анализе культуральных сред после выращивания клеток различных поколений исходной культуры не обнаруживается различий в уровне синтеза интерлейкина-2. Таким образом, исходный уровень продукции этого белка штаммом GRF-18-pJDB(ALPHOIL) сохраняется на протяжении, по крайней мере, 20 генераций.

Биологическая активность синтезированного и секретированного штаммом GRF-18-pJDB(ALPHOIL) полипептида, измеренная по стандартной методике с использованием клеточной линии CТLL, по отношению к международному стандарту, составила величину порядка 10 млн. МЕ/мг очищенного белка, что практически равно удельной активности природного интерлейкина-2.

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что полученный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* GRF18-pJDB(ALPHOIL) синтезирует и секретирует в культуральную среду интерлейкин-2 человека на уровне около 1 мг/л, штамм может стабильно поддерживаться на средах, обеспечивающих репрессию синтеза интерлейкина-2. Секретируемый этим штаммом интерлейкин-2 имеет биологическую активность близкую к активности природного интерлейкина-2.

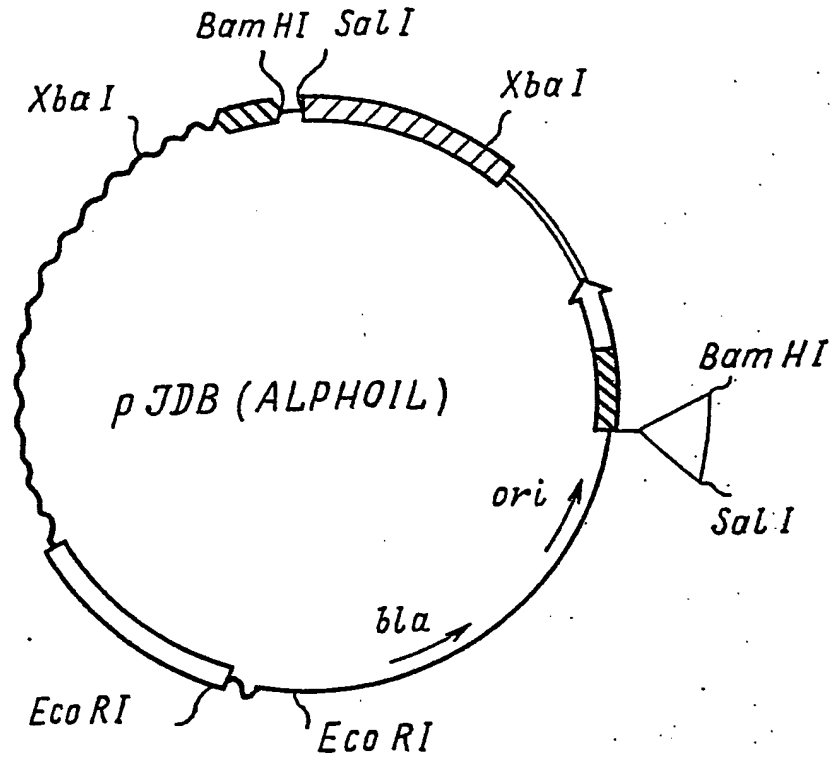
Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* GRF18-pJDB(ALPHOIL) - продуцент человеческого интерлейкина-2 - депонирован во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ-У1038.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ.

- 5 1. Метод получения полипептида с активностью интерлейкина-2 человека, секретируемого клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с помощью конструкций рекомбинантной ДНК, в которых последовательности ДНК, кодирующие слитый полипептид препропептида α -фактора и интерлейкина-2 человека, поставлены под контроль гибридного промотора.
- 10 2. Метод согласно пункту 1, в котором упомянутый гибридный промотор состоит из фрагментов регулируемого дрожжевого промотора и промотора гена MF α 1.
- 15 3. Метод согласно пункту 2, в котором упомянутый регулируемый промотор является промотором гена PHO5.
- 20 4. Метод согласно пункту 3, в котором в роли гибридного промотора используется промотор плазмиды pAC137.
- 25 5. Метод согласно пункту 3, в котором гибридный промотор сконструирован слиянием 0.45 т.п.о. BamHI-Eco47III фрагмента промотора PHO5 и 0.38 т.п.о. BspRI-HindIII фрагмента гена MF α 1, включающего части промотора и кодирующей области этого гена.
- 30 6. Метод согласно пункту 1, в котором упомянутой рекомбинантной конструкцией является плазида pJDB(ALPHOIL).
7. Метод улучшения продуктивности и стабильности штаммов продуцентов гетерологичных белков в дрожжах за счет использования гибридных промоторов согласно пунктам 3, 4, 5.
8. Рекомбинантная плазида pJDB(ALPHOIL).

9. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* GRF18-pJDB(ALPHOIL),
депонированный во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов
под номером ВКПМ-У1038.

1/3



Фрагменты ДНК:

- бактериальная плазмидная ДНК
- ~~~~~ фрагмент 2мкм дрожжей
- ▭ ген LEI 2 дрожжей
- ▨ кодирующий участок гена IL-2 человека
- ▬ препрообласть гена MF α I
- ▧ терминатор транскрипции гена PHO5 дрожжей
- ▧← гибридный PHO5-MF α I промотор

FIG.1

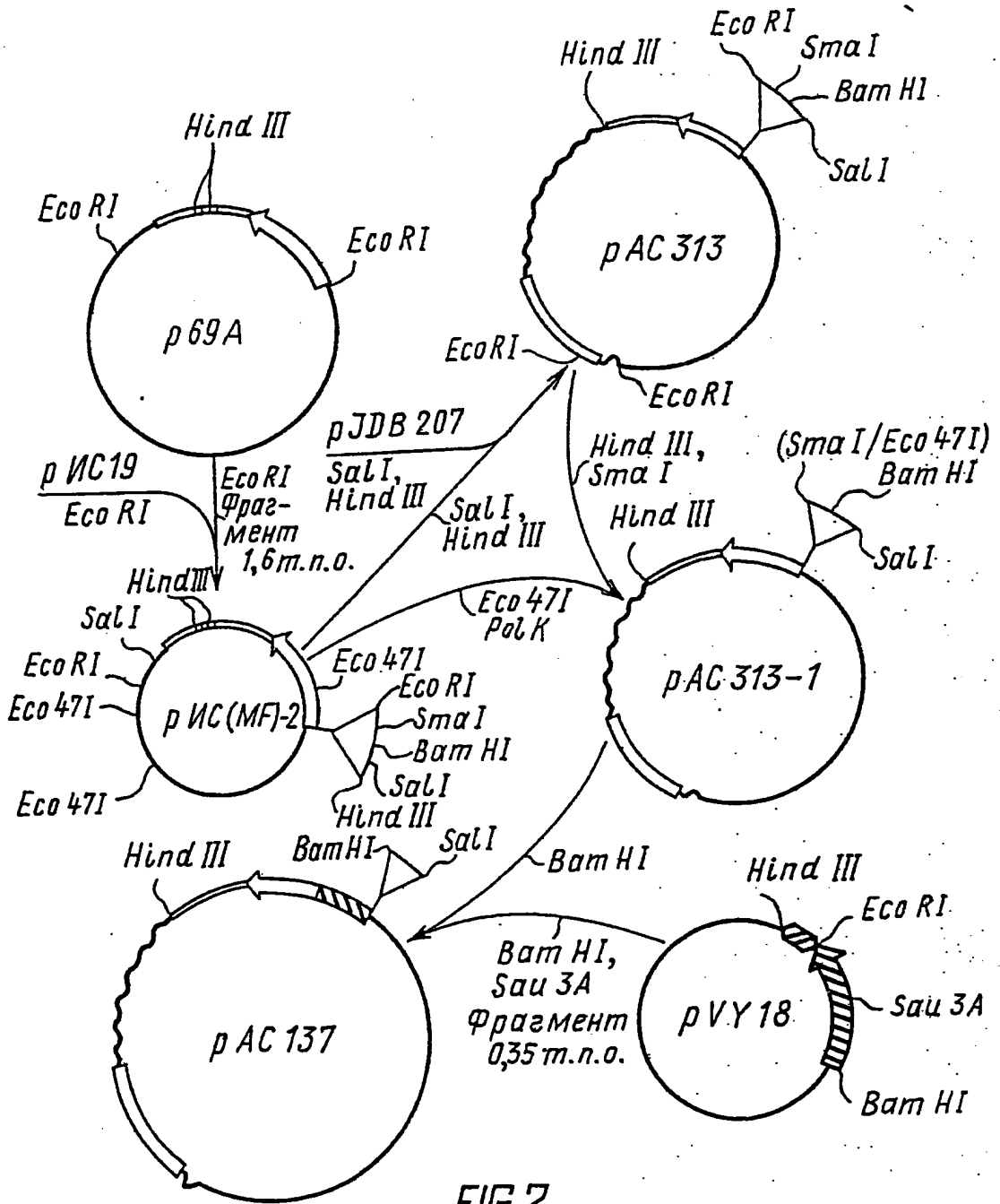


FIG.2

3/3

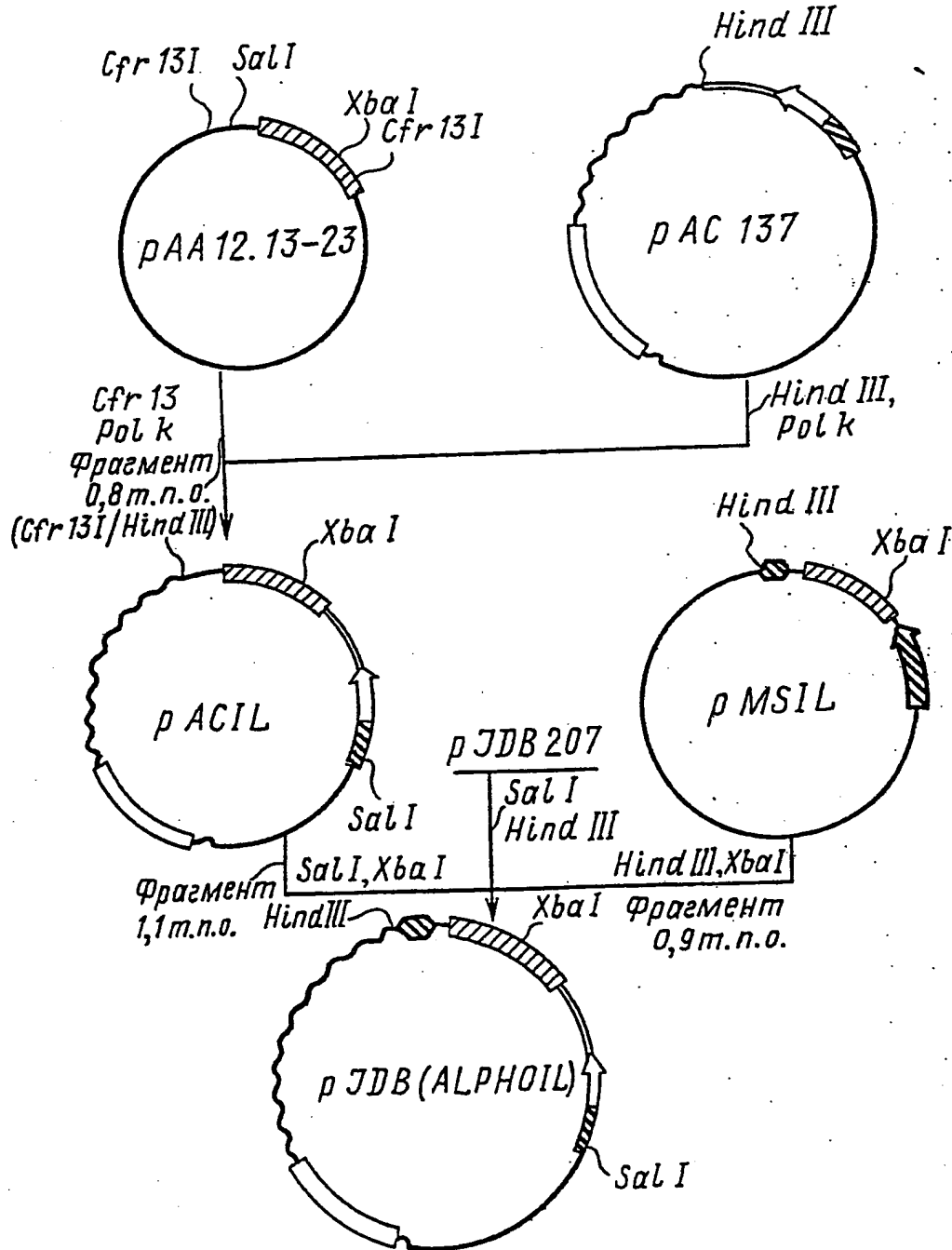


FIG. 3

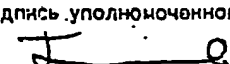
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/SU 89/00257**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
IPC ⁵ C 12 N 15/26, 1/19, 15/81				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁷				
Classification System	Classification Symbols			
IPC ⁴	C 12 N 1/00, 1/20, 15/00, C 12 P 21/00			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹				
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³		
A	EP, A1, 0142268 (AJINOMOTO CO., INC et al.), 22 May 1985 (22.05.85), the claims, figures 1-5 ---	1-3		
A	US, A, 4738927 (AJINOMOTO CO, INC), 19 April 1988 (19.04.88), the claims, figures 1-8 ---	1-3		
A	EP, A2, 0194818 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD), 17 September 1986 (17.09.86), the claims, figures 1,2 (cited in the descrip- tion) ----	1-3		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			<ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 	<ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family
<ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 	<ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family 			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
15 June 1990 (15.06.90)	06 July 1990 (06.07.90)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
ISA/SU				

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка № PCT/SU 89/00257

I. КЛАССИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (если применяются несколько классификационных индексов, укажите все) ⁶		
В соответствии с Международной классификацией изобретений (МКИ) или как в соответствии с национальной классификацией, так и с МКИ 5-CI2N I5/26, I/I9, I5/8I .		
II. ОБЛАСТИ ПОИСКА		
Минимум документации, охватывающей поиском ⁷		
Система классификации	Классификационные рубрики	
МКИ⁴	CI2N I/00, I/20, I5/00, CI2P 2I/00	
Документация, охватываемая поиском и не входившая в минимум документации, в той мере, насколько она входит в область поиска ⁶		
III. ДОКУМЕНТЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ПРЕДМЕТУ ПОИСКА⁹		
Категория ⁸	Ссылка на документ ¹¹ , с указанием, где необходимо, частей, относящихся к предмету поиска ¹²	Относится к пункту формулы № ¹³
А	EP, A1, 0142268 (AJINOMOTO CO., INC ^И другие), 22 мая 1985 (22.05.85), формула, фиг. 1-5	I-3
А	US, A, 4738927 (AJINOMOTO CO, INC), 19 апреля 1988 (19.04.88), формула, фиг. 1-8	I-3
А	EP, A2, 0194818 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD), 17 сентября 1986 (17.09.86), формула, фиг. 1, 2 (указано в описании)	I-3
¹⁰ Особые категории ссылаемых документов ¹² :		
А* документ, определяющий общий уровень техники, который не имеет наиболее близкого отношения к предмету поиска.		
В* более ранний патентный документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее.		
I* документ, подвергающий сомнению призыванию (я) на приоритет, или который производится с целью установления даты публикации другого ссылаемого документа, а также в других целях (как указано).		
O* документ, относящийся к устному раскрытию, приложению, выставке и т. д.		
P* документ, опубликованный до даты международной подачи, но в котором нет призывания к приоритету.		
T* более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или даты приоритета и не порочащий заявку, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение.		
X* документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной и изобретательским уровнем.		
Y* документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; документ в сочетании с одним или несколькими подобными документами порочит изобретательский уровень заявленного изобретения, такое сочетание должно быть очевидно для лица, обладающего познаниями в данной области техники.		
Z* документ, являющийся членом одного и того же патентного семейства.		
IV. УДОСТОВЕРЕНИЕ ОТЧЕТА		
Дата действительного завершения международного поиска 15 ИЮНЯ 1990 (15.06.90)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 06 ИЮЛЯ 1990 (06.07.90)	
Международный поисковый орган ISA/SU	Подпись уполномоченного лица  Н.Щепелев	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.